sebia

HYDRAGEL 7 ISO-PAL

Ref. 4112

HYDRAGEL 15 ISO-PAL

Ref. 4132

IVD

CE

2008/01

ESPECIFICACIONES DE USO

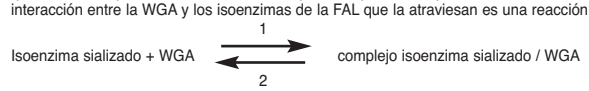
Los kits HYDRAGEL 7 ISO-PAL e HYDRAGEL 15 ISO-PAL están diseñados para la identificación y cuantificación de los isoenzimas de la fosfatasa alcalina (FAL) en suero humano. Los kits se usan junto con el sistema de electroforesis semiautomático HYDRASYS para obtener geles listos para su interpretación. Las muestras de suero son sometidas a electroforesis en geles de agarosa tamponados (pH 9.1). Los isoenzimas de la FAL separados son visualizados usando un sustrato cromogénico específico. Los geles secos están listos para un examen visual y para la densitometría, para obtener una cuantificación relativa precisa de cada fracción.

Cada gel de agarosa está diseñado para el análisis de:
- 3 muestras en el kit HYDRAGEL 7 ISO-PAL,
- 7 muestras en el kit HYDRAGEL 15 ISO-PAL.

Para Uso Diagnóstico *In Vitro*.

PRINCIPIO DEL TEST

La fosfatasa alcalina es una metaloglicoproteína con actividad monofosfoesterasa. Cataliza la hidrólisis de ésteres monofosfóricos, que es activada por iones magnesio en medio alcalino.
Este enzima se encuentra en muchos tejidos humanos, por ejemplo, hígado, hueso, riñón, intestino y placenta. Su elevación es evidente en una variedad de afecciones hepáticas y no hepáticas, así como en el crecimiento adolescente normal. Los enzimas de la fosfatasa alcalina están codificados por 3 genes estructurales: 2 genes codifican los isoenzimas placentario e intestinal, respectivamente. El 3 er gen, denominado "gen de tejido no específico" se expresa en una variedad de tejidos tales como el hueso, el hígado y el riñón.
Los isoenzimas individuales de la FAL pueden separarse normalmente mediante electroforesis, de acuerdo con las diferencias de carga. Sin embargo, las movilidades electroforéticas de los isoenzimas hepático y óseo son inducidas sólo por glicosilación o modificaciones postraduccionales y, por lo tanto, son bastante parecidas. Deben separarse con un tratamiento especial de la muestra. La cuantificación de los isoenzimas de la FAL ayuda a identificar los tejidos responsables de la elevación.
La electroforesis de suero humano en los geles HYDRAGEL 7/15 ISO-PAL separa casi todos los isoenzimas de la fosfatasa alcalina, excepto el hepático 1 (L1) y el óseo (B), y el placentario 1 (P1) cuando está presente, que migran juntos en una única fracción ancha.
De ánodo a cátodo, el patrón de migración es como sigue (vea la figura "Patrones de Migración"): L1 + B (+ P1) ; hepático 2 (L2, este isoenzima se conoce también como macrohepático o hepático rápido) ; intestinal 1, 2 y 3 (I1, I2 e I3). El placentario 2 (P2), cuando está presente, está situado entre I1 e I2. En algunas muestras muy ictéricas puede observarse una fracción adicional cerca del punto de aplicación. Es un complejo de fosfatasa alcalina y lipoproteínas denominado lipo-ISO-PAL (o ultra rápida, UF, en otros procedimientos).
Para superar las dificultades inherentes al separar los isoenzimas L1 y B se han explorado varios tratamientos de la muestra, y algunos de ellos se usan rutinariamente, por ejemplo, inactivación diferencial mediante calor, urea o aminoácidos, precipitación con un antisuero específico, sensibilidad diferencial a la desialización enzimática con neuraminidasa, etcétera.
Todos los isoenzimas de la FAL están sializados en cierto grado excepto los isoenzimas intestinales, que carecen de ácido siálico. El sistema de SEBIA utiliza el diferente grado de sialización de los isoenzimas L1 y B para separarlos. La lectina de germen de trigo (WGA, Wheat Germ Agglutinin) presenta una fuerte afinidad por los residuos de ácido siálico, y por consiguiente se une preferentemente al isoenzima óseo, que es el que está más sializado. Para realizar el análisis, cada muestra se aplica por duplicado. Durante la migración, uno de los duplicados de la muestra pasa a través de la lectina, que ha sido depositada anódicamente respecto al punto de aplicación de la muestra (la lectina se mueve sólo ligeramente hacia el cátodo). La interacción entre la WGA y los isoenzimas de la FAL que la atraviesan es una reacción reversible:



Bajo las condiciones escogidas para la electroforesis, la interacción de la WGA con los isoenzimas L1, L2, P1 y P2 es débil y la reacción de arriba se desplaza hacia la izquierda. Por lo tanto, estos isoenzimas se ven ralentizados sólo ligeramente si se compara con su posición en el patrón obtenido al realizar la electroforesis sin lectina. Por otra parte, la interacción con el isoenzima B, rico en ácido siálico, es fuerte y suficiente para precipitar la mayoría de B como una banda definida cerca del punto de aplicación de la lectina. Cuando la capacidad de unión de la lectina es excedida (por ejemplo, si el isoenzima óseo está muy elevado, como sucede en los cánceres óseos y en el metabolismo óseo activo en la edad de crecimiento), la precipitación puede ser incompleta y ocasionalmente puede observarse una mancha anódica. La mancha no afecta a la densitometría del perfil "con lectina" (consulte la "Interpretación"). Los isoenzimas de la FAL separados son visualizados usando un sustrato cromogénico específico, 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato / Nitro Azul de Tetrazolio en un tampón Aminometil Propanol (AMP), pH 10.0.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS EN LOS KITS HYDRAGEL 7 ISO-PAL E HYDRAGEL 15 ISO-PAL

ARTÍCULOS	PN 4112*	PN 4132*
Geles de Agarosa (listos para usar)	10 geles	10 geles
Esponjas Tamponadas (listas para usar)	10 paquetes de 2	10 paquetes de 2
Lectina (liofilizada)	1 vial	2 viales
Sustrato (listo para usar)	1 vial de 20 mL	2 viales de 20 mL
Cromógeno (solución stock)	1 vial de 10 mL	1 vial de 10 mL
Aplicadores (listos para usar)	2 cajas de 10 (7 dientes)	2 cajas de 10 (15 dientes)
Papeles de Filtro - Finos	1 paquete de 10	1 paquete de 10
Papeles de Filtro - Gruesos	1 paquete de 10	1 paquete de 10
Máscaras de plástico	1 paquete de 10	1 paquete de 10

** Los kits HYDRAGEL 7 ISO-PAL e HYDRAGEL 15 ISO-PAL contienen aplicadores con 7 y 15 dientes, respectivamente. Como cada muestra se aplica por duplicado, se pueden analizar 3 ó 7 muestras problema por gel, respectivamente. El carril restante puede usarse para el control.*

PARA OBTENER RESULTADOS ÓPTIMOS :
Los elementos de un mismo kit deben utilizarse conjuntamente y según las instrucciones incluidas.
LEER ATENTAMENTE LAS INSTRUCCIONES.

1. GELES DE AGAROSA

Preparación

Los geles de agarosa están listos para su uso. Cada gel contiene: agarosa, 1 g/dL ; tampón alcalino pH 9.1 ± 0.05 ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ADVERTENCIA: Los geles contienen un 0.10 % de azida sódica. ¡No los ingiera! ¡Si los ha ingerido consulte a un médico inmediatamente!

Uso

Medio de soporte para la electroforesis de los isoenzimas de la fosfatasa alcalina.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacene los geles horizontalmente en sus recipientes protectores originales preferentemente refrigerados (2 a 8 °C). (La flecha situada en la cara frontal de la caja del kit debe apuntar hacia arriba).
Evite fluctuaciones de temperatura evidentes durante el almacenaje (por ejemplo, no los almacene cerca de una ventana o de una fuente de calor).
Los geles son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del envoltorio del gel.
NO LOS CONGELE.
Deseche el gel cuando:
(I) se formen cristales o precipitados en la superficie del gel o su textura sea muy blanda (consecuencias de la congelación del gel),
(II) se observe crecimiento bacteriano o fúngico,
(III)haya una cantidad de líquido anormal en la caja del gel (como resultado de la exudación del tampón debida a un almacenamiento inadecuado).

2. ESPONJAS TAMPONADAS

Preparación

Las esponjas tamponadas están listas para su uso. Cada una contiene: tampón alcalino pH 9.3 ± 0.2 ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ADVERTENCIA: El tampón de las esponjas contiene un 0.5 % de azida sódica. ¡No las ingiera! ¡Son perjudiciales si se ingieren! ¡Si las ha ingerido accidentalmente consulte a un médico inmediatamente! Al desechar el producto, evite que contacte con ácidos, plomo o cobre, ya que se conoce su tendencia a formar compuestos explosivos o tóxicos con la azida sódica. El contacto del producto con ácidos libera un gas muy tóxico. Cuando se deshaga del producto evite que contacte con ellos. Si el producto contacta con la piel lávese inmediatamente con agua en abundancia.

Uso

Las esponjas tamponadas actúan como un reservorio del tampón de electroforesis y aseguran el contacto entre el gel y los electrodos.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Las esponjas tamponadas pueden conservarse a temperatura ambiente o en la nevera.
Deben ser conservadas horizontalmente en su bolsa protectora (la flecha situada en la parte frontal del kit debe apuntar hacia arriba).
Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en su bolsa protectora. NO LAS CONGELE.
Deseche las esponjas tamponadas si la bolsa está abierta o si las esponjas están secas.

3. LECTINA*

Preparación

El vial de lectina contiene Wheat Germ Agglutinin (WGA) en una forma liofilizada estabilizada.
Reconstituya el vial de lectina con exactamente 0.5 mL de salina. Cierre el vial. Mezcle suavemente y deje el vial en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después, mezcle con cuidado para obtener una solución de lectina clara, que está lista para su uso.

Uso

Para el tratamiento de las muestras de suero que migran durante las separaciones electroforéticas.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacene la lectina liofilizada refrigerada (2 a 8 °C). Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial de lectina.
Después de la reconstitución, la solución de lectina debe conservarse a – 20 °C ; con ese propósito, recomendamos preparar alícuotas de 50 µL ó 100 µL para el HYDRAGEL 7 ISO-PAL ó HYDRAGEL 15 ISO-PAL, respectivamente. O bien, se puede conservar todo el volumen reconstituido a – 20 °C ; puede sufrir diez (10) ciclos de congelación/descongelación sin ningún efecto adverso en su funcionamiento, siempre y cuando la solución no esté expuesta a la temperatura ambiente durante más de 15 minutos en cada ciclo.
La solución de lectina congelada es estable a – 20 °C durante un máximo de 6 meses.

4. SUSTRATO

Preparación

El sustrato está listo para su uso. Contiene: BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato) en tampón Aminometil Propanol (AMP) pH 10.0, y aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.
Prepare la solución de visualización protegida de la luz justo antes de usarla:
En el HYDRAGEL 7 ISO-PAL, añada 0.5 mL de cromógeno a 2 mL de sustrato y mezcle.
En el HYDRAGEL 15 ISO-PAL, añada 1 mL de cromógeno a 4 mL de sustrato y mezcle.

Uso

Para preparar la solución de visualización.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacene el sustrato a temperatura ambiente o refrigerado. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial de sustrato.
El sustrato puede presentar una leve cristalización sin ningún efecto adverso en su funcionamiento.

5. CROMÓGENO

Preparación

El cromógeno está listo para su uso. Contiene: NBT (Nitro Azul de Tetrazolio) en agua.

Uso

Para preparar la solución de revelado como se ha descrito en el párrafo 4.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacene el cromógeno a temperatura ambiente o refrigerado. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en la etiqueta del vial de cromógeno.

6. APLICADORES

Uso
Aplicadores precortados, de un solo uso, para aplicar las muestras y la solución de lectina en el gel.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene los aplicadores en un lugar seco a temperatura ambiente o refrigerados.

7. PAPELES DE FILTRO FINOS

Uso
Papeles de filtro finos absorbentes precortados, de un solo uso, para absorber el exceso de humedad de la superficie del gel antes de la aplicación de la muestra.

Conservación
Les papeles de filtro finos deben conservarse en un lugar seco a temperatura ambiente o en la nevera.

8. PAPELES DE FILTRO GRUESOS

Uso
Papeles de filtro gruesos absorbentes precortados, de un solo uso, para secar el gel después de la visualización enzimática.

Conservación
Los papeles de filtro gruesos deben conservarse en un lugar seco a temperatura ambiente o en la nevera.

9. MÁSCARAS DE PLÁSTICO

Uso
Láminas de plástico, de un solo uso, para proteger el gel de la evaporación durante la migración electroforética.

** NOTA: Durante el transporte, los geles y la lectina pueden permanecer sin refrigeración (15 a 30 °C) durante 15 días sin ningún efecto adverso en su funcionamiento.*

REACTIVOS NECESARIOS (pero suministrados a parte de los kits)

1. SALINA

Preparación
Prepare una solución de NaCl 0.15 M (0.9 g/dL) con agua destilada o desionizada.

Uso
Para reconstituir el vial de lectina.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene la salina a temperatura ambiente o refrigerada. Deséchela después de 3 meses o si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana. Para períodos de almacenaje más prolongados, añada azida sódica, 0.1 g/dL.

2. SOLUCIÓN DECOLORANTE

Preparación
Cada vial de la Solución Decolorante stock (SEBIA, PN 4540, 10 viales de 100 mL) se diluye hasta 100 litros con agua destilada o desionizada. Es conveniente diluir sólo 5 mL de la solución stock hasta 5 litros, que es el volumen del contenedor de solución decolorante. Después de la dilución, la solución decolorante de trabajo contiene: ácido cítrico, 50 mg/dL.

Uso
Para lavar el gel después de la visualización enzimática y secado y para lavar el compartimento de tinción del HYDRASYS.
Para neutralizar la acidez de la solución decolorante al desecharla, dispense 15 mL de una solución al 50 % de hidróxido sódico en el contenedor de desechos vacío.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene la solución decolorante stock a temperatura ambiente o refrigerada. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial de solución decolorante.
La solución decolorante de trabajo es estable durante una semana a temperatura ambiente en una botella cerrada. No le añada azida sódica.
Deseche la solución decolorante de trabajo si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana.
Para impedir la proliferación microbiana en la solución decolorante diluida que se vaya a conservar durante más de una semana, añada 5 µL/dL de ProClin 300.
El decolorante diluido al que se ha añadido ProClin es estable en un contenedor cerrado a temperatura ambiente o en la nevera hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de decolorante.

3. SOLUCIÓN DE LAVADO HYDRASYS

Preparación
Cada vial de la Solución de Lavado HYDRASYS stock (SEBIA, PN 4541, 10 viales de 80 mL) se diluye hasta 5 litros con agua destilada o desionizada. Después de la dilución, la solución de lavado de trabajo contiene: tampón alcalino pH 8.8 ± 0.3 ; azida sódica.

ADVERTENCIA: La solución de lavado stock contiene un 0.625 % de azida sódica. ¡No la ingiera! ¡Si la ha ingerido consulte a un médico inmediatamente! La azida sódica puede formar compuestos explosivos o tóxicos en contacto con ácidos, plomo o cobre. Lave siempre con una gran cantidad de agua al desechar el producto.

Uso
La solución de lavado HYDRASYS está diseñada para limpiar el compartimento de tinción del HYDRASYS. Úsela periódicamente, por ejemplo, si el instrumento se utiliza diariamente, lave el compartimento de tinción semanalmente.
Consulte la hoja de instrucciones para conocer el modo de empleo.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene las soluciones de lavado stock y de trabajo en contenedores cerrados a temperatura ambiente o refrigeradas. Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial de solución de lavado.
Deseche la solución de lavado de trabajo si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Sistema HYDRASYS SEBIA, PN 1210 ó PN 1211.
2. Micropipeteador, manual o automático, como el HYDRAPLUS SEBIA, PN 1216 ó HYDRAPLUS 2 SEBIA, PN 1217, para una forma alternativa de cargar los aplicadores de muestra.
3. Cámara de Almacenamiento Húmeda suministrada con el HYDRASYS, PN 1270.
4. Barra de Guía de las Plantillas SEBIA, suministrada con el HYDRASYS.
5. Kit de Accesorios ISO-LDH, ISO-PAL, CHOL para HYDRASYS, SEBIA, PN 1261.
6. Pipetas: 10 µL, 200 µL, 1 mL y 5 mL.
7 Densitómetro / escáner capaz de escanear geles de 82 x 51 mm ó 82 x 102 mm a 570 nm (filtro amarillo), por ejemplo, HYRYS SEBIA, DVSE SEBIA o el programa PHORESIS para escáner de sobremesa. Consulte las instrucciones del fabricante para los procedimientos de funcionamiento y calibración.
8. Materiales de control de calidad.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y almacenamiento de muestras

Se recomienda analizar muestras de suero frescas. Las muestras deben obtenerse de acuerdo con los procedimientos establecidos de uso en el laboratorio clínico. Almacene las muestras entre 2 y 8 °C tan pronto como sea posible después de su obtención, siendo así estables durante una semana.

Preparación de las muestras

Use suero neto. Cuando la actividad total de la fosfatasa alcalina sea elevada, diluya las muestras de suero con salina hasta unas 600 IU/L.

Muestras a descartar

No use muestras hemolizadas. Los enzimas eritrocíticos pueden interferir en la reacción.
No use muestras que contengan un inhibidor de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina tales como el EDTA, el citrato o el oxalato.

PROCEDIMIENTO

El sistema HYDRASYS es un instrumento semiautomático multiparamétrico. Las etapas automáticas incluyen el procesamiento de los geles de agarosa HYDRAGEL en el orden siguiente: aplicación de las muestras, migración electroforética, incubación con el sustrato, secado con papel, lavado y secado final del gel. Las etapas manuales incluyen el manejo de las muestras y los geles, la aplicación de los reactivos y la preparación del instrumento para el funcionamiento. La temperatura de la placa del módulo de migración está controlada por efecto peltier.
LEA DETENIDAMENTE EL MANUAL DE INSTRUCCIONES DEL HYDRASYS.

I. PREPARACIÓN DE LA MIGRACIÓN

1. Encienda el instrumento HYDRASYS.
2. Es necesario usar dos aplicadores por cada gel HYDRAGEL 7 ISO-PAL ó HYDRAGEL 15 ISO-PAL, para aplicar las muestras de suero y las solución de lectina.
   Ponga los aplicadores, dos por cada HYDRAGEL 7 ISO-PAL (7 dientes para 3 muestras) o HYDRAGEL 15 ISO-PAL (15 dientes para 7 muestras), en una superficie plana con los números de los pocillos hacia arriba (Fig. 1).
   - Primer aplicador: aplique 10 µL de cada muestra de suero en 2 pocillos adyacentes.
   - Segundo aplicador: aplique 10 µL de solución de lectina en cada pocillo de número par.
   - Cargue cada aplicador en menos de 2 minutos. Se puede aplicar un suero control valorado en el último pocillo de cada aplicador.
   - Ponga los aplicadores en la cámara de almacenamiento húmeda con los dientes hacia arriba (cójalos por el marco protector de plástico de los dientes).
   - Deje que las muestras difundan en los dientes durante 5 minutos después de la última aplicación de muestra

   Consulte la hoja de instrucciones de la cámara húmeda para más detalles.
3. Abra la tapa del módulo de migración y eleve los soportes del aplicador y los electrodos.
   ADVERTENCIA: ¡No cierre nunca la tapa cuando los soportes estén elevados!
4. Seleccione el programa de migración en el menú del instrumento (lado izquierdo del teclado): "7 ISO-PAL" para el HYDRAGEL 7 ISO-PAL ó "15 ISO-PAL" para el HYDRAGEL 15 ISO-PAL.
5. Saque las esponjas tamponadas de su envoltorio. Cójalas por los extremos de plástico. Engarce los extremos perforados del respaldo de plástico de las esponjas con los polos del soporte de los electrodos ; el respaldo de plástico de las esponjas debe quedar encarado hacia el soporte (Fig. 2).
6. Saque el gel de agarosa HYDRAGEL de su envoltorio.
   - Extienda un papel de filtro fino de manera rápida y uniforme sobre la superficie del gel para absorber el exceso de líquido. Retire el papel inmediatamente.

   ADVERTENCIA: Para evitar que se deshidrate, no deje que el papel de filtro contacte con el gel durante mucho tiempo.
   - Dispense 120 µL de agua destilada para el HYDRAGEL 7 ISO-PAL, ó 200 µL para el HYDRAGEL 15 ISO-PAL, en el tercio inferior del marco impreso en la placa de control de la temperatura del módulo de migración.
   - Ponga el gel (con el lado de agarosa hacia arriba) con su borde inferior contra el tope situado debajo del marco impreso (Fig. 3).
   - Doble el gel y haga que contacte con el agua (Fig. 3). Asegúrese de que no se formen burbujas de aire, de que el agua esté extendida bajo toda la superficie del gel y de que éste esté alineado con el marco impreso.
7. Coloque una máscara de plástico sobre el gel:
   - Coja una máscara de plástico.
   - Alinee el lado superior de la máscara de plástico con la línea horizontal impresa en el soporte de plástico del gel.
   - Aplique la máscara de plástico sobre la superficie del gel. Evite que se formen burbujas de aire entre el gel y la máscara de plástico.
   - Sostenga con un dedo la máscara de plástico por un lado en la placa del módulo de migración ; elimine suavemente las burbujas de aire de la superficie del gel.
   - Evite mover el gel en la placa de migración durante esta manipulación.

   ADVERTENCIA: La máscara de plástico debe cubrir el lado superior del gel sin superponerse a la zona de contacto situada entre el gel y la esponja tamponada.
8. Baje ambos soportes. En esta posición las esponjas tamponadas no tocan el gel. NO FUERCE LOS SOPORTES HACIA ABAJO.

9. Saque los aplicadores de la cámara húmeda. Cójalos por el marco protector.
   - Rompa el marco protector de los dientes del aplicador.
   - Coloque el aplicador con las muestras en la posición No. 3 del soporte del aplicador.
   - Coloque el aplicador con la lectina en la posición No. 4 del soporte del aplicador.
   - Empuje los aplicadores hacia el lado izquierdo.

   IMPORTANTE: Los números impresos en los aplicadores deben quedar de cara al operario (Fig. 4).
10. Cierre la tapa del módulo de migración.
11. Inicie el procedimiento inmediatamente presionando la flecha verde "INICIO" del lado izquierdo del teclado.

    IMPORTANTE: Asegúrese de que la entrada de aire de ventilación del lado derecho del instrumento no está bloqueada.

MIGRACIÓN – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Los dos soportes descienden de forma que las esponjas tamponadas y los aplicadores contactan con la superficie del gel.
- El soporte del aplicador de muestra se eleva.
- La migración se realiza a 10 W de potencia constante en el HYDRAGEL 7 ISO-PAL, ó a 20 W de potencia constante en el HYDRAGEL 15 ISO-PAL, a 35 °C seguidos por 30 °C hasta que se han acumulado 80 Vh (durante unos 18 minutos).
- El soporte de los electrodos se eleva para desconectar los electrodos.
- Suena un pitido y la tapa se desbloquea. Esta señal se mantiene hasta que el operario interviene. Aparece en pantalla el siguiente mensaje intermitente: "⇩ SUSTRATO".

  NOTA: La tapa del módulo de migración permanece cerrada durante todas las etapas de la migración.

II. PREPARACIÓN PARA LA INCUBACIÓN CON EL SUSTRATO DE ISO-PAL

1. Después de la migración, abra la tapa. El mensaje siguiente deja de ser intermitente: "⇩ SUSTRATO".
2. Saque los aplicadores de muestra y deséchelos.
3. Eleve ambos soportes, extraiga las esponjas tamponadas por sus extremos de plástico y deséchelas.
   - Saque el soporte de los electrodos y los aplicadores.
   - Limpie los electrodos limpiándolos cuidadosamente con un pañuelo de papel suave humedecido.
   - Deje el gel en el sitio que ocupa en el módulo de migración.
4. Saque la máscara de plástico por una esquina y deséchela.
5. Prepare la plantilla de aplicación de reactivos 4 como sigue (Fig. 5):
   - Coloque la guía de la plantilla de aplicación en las horquillas de sujeción (la guía puede estar colocada en el HYDRASYS en todo momento).
   - Sostenga la solapa de la plantilla y ponga sus ganchos en las marcas de la guía.
   - Haga descender la plantilla sobre el gel.
6. Después de haber mezclado el cromógeno y el sustrato (consulte REACTIVOS Y MATERIALES, párrafo 4) aplique inmediatamente 2.5 mL de la solución del sustrato de ISO-PAL en el HYDRAGEL 7 ISO-PAL, ó 5 mL en el HYDRAGEL 15 ISO-PAL, como sigue (Fig. 6):
   - Sostenga la pipeta verticalmente.
   - Apoye suavemente la punta de la pipeta en el agujero de la plantilla.
   - Dispense el reactivo con cuidado y progresivamente sin introducir burbujas de aire por debajo de la plantilla.
7. Cierre la tapa del HYDRASYS.
8. Inicie inmediatamente la incubación presionando la flecha verde "INICIO" del lado izquierdo del teclado. En pantalla aparece el mensaje siguiente: "INCUBACIÓN".

INCUBACIÓN – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Incubación a 37 °C durante 45 minutos, y a 50 °C durante 15 minutos.
- Suena un pitido y la tapa se desbloquea. Esta señal se mantiene hasta que el operario interviene. En pantalla aparece el siguiente mensaje intermitente: "⇧ SUSTRATO ⇩ PAPEL".

  NOTA: Durante la incubación la tapa del módulo de migración permanece bloqueada.

III. ELIMINACIÓN DEL SUSTRATO Y APLICACIÓN DEL PAPEL DE FILTRO

1. Abra la tapar. El mensaje siguiente deja de ser intermitente: "⇧ SUSTRATO ⇩ PAPEL".
2. Aspire los restos de solución del sustrato:
   - Sostenga la pipeta verticalmente y apoye suavemente la punta de la pipeta en el pocillo (Fig. 6).
   - Aspire el reactivo cuidadosa y progresivamente.
3. Saque la plantilla:
   - Coja la solapa de la plantilla.
   - Eleve la plantilla y sáquela.
4. Aplique un papel de filtro grueso sobre el gel:
   - Incline el papel de filtro unos 45 °.
   - Alinee el lado inferior del papel de filtro con el borde del gel.
   - Haga descender el papel de filtro sobre el gel.
   - Presione sobre toda la superficie del papel de filtro para asegurar una perfecta adherencia al gel.
5. Cierre la tapa del HYDRASYS.
6. Inicie la secuencia de secado con el papel de filtro presionando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado). En pantalla aparece el mensaje siguiente: "ABSORCIÓN PAPEL".
7. Limpie la plantilla con agua destilada o alcohol y séquela completamente con un papel absorbente suave. Antes de volver a usarla asegúrese de que la plantilla esté completamente seca.

APLICACIÓN DE PAPEL DE FILTRO – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Secado con papel de filtro a 45 °C durante 3 minutos.
- Suena un pitido hasta que el operario interviene. En pantalla aparece el siguiente mensaje intermitente: "⇧ PAPEL".

  NOTA: Durante el secado con papel la tapa del módulo de migración permanece bloqueada.

IV. SECADO DEL GEL

1. Abra la tapa.
2. Saque el papel de filtro y deje el gel en su lugar.
3. Cierre la tapa del HYDRASYS.
4. Inicie el secado presionando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado izquierdo del teclado). En pantalla aparece el mensaje siguiente: "SECADO".

SECADO – DESCRIPCIÓN DE LAS ETAPAS AUTOMÁTICAS

- Secado del gel a 60 °C, durante 2 minutos.
- Suena un pitido y la tapa se desbloquea. La temperatura de la placa permanece a 50 °C hasta que se abre la tapa.

NOTA: Durante el secado la tapa del módulo de migración permanece bloqueada.

V. LAVADO Y PROCESAMIENTO FINAL DEL GEL

1. Abra la tapa.
2. Saque el gel seco.
3. Abra el soporte del gel. Extiéndalo y coloque el gel (con el lado de agarosa hacia arriba) en las ranuras de las dos barras y cierre el soporte. Asegúrese de que el gel esté colocado correctamente dentro del soporte (Fig. 7).
4. Ponga el soporte del gel en el módulo de procesamiento / tinción del gel.

   IMPORTANTE: Antes de iniciar el programa de procesamiento / tinción del gel, compruebe lo siguiente:

   - el contenedor de solución decolorante contiene por lo menos 400 mL de solución decolorante ;
   - el contenedor de desechos está vacío.

   Para conocer en qué posiciones conectar los reactivos: consulte la información que aparece en la pantalla del instrumento (seleccione la tecla: PANTALLA DE CANALES).

   IMPORTANTE: No olvide bloquear los canales no utilizados.
5. Seleccione el programa de lavado "LAVADO ISO ENZIMAS" en el menú del instrumento e inicie el procedimiento presionando la tecla "INICIO" (flecha verde del lado derecho del teclado).
   Durante el lavado y el secado el compartimento permanece bloqueado.
   Después del enfriamiento, un pitido audible indica que el compartimento se desbloquea (la ventilación se mantiene hasta que se extrae el soporte del gel).
6. Extraiga el soporte del gel del compartimento ; abra las horquillas y saque el gel seco. Si es necesario, limpie el reverso (el lado de soporte de plástico) del gel seco con un pañuelo de papel humedecido. El gel está listo para su evaluación.
7. La temperatura de la placa desciende hasta 20 °C en menos de 5 minutos. Cuando se han alcanzado 20 °C se puede iniciar una nueva migración.
8. Coloque en su sitio los soportes del aplicador de muestras y los electrodos.
9. Limpie la placa de control de la temperatura con un pañuelo de papel suave humedecido.

VI. EVALUACIÓN

Evalúe los geles visualmente. Cuando sea necesario, léalos usando un densitómetro / escáner con un filtro amarillo o a 570 nm.

RESULTADOS

Control de Calidad

Se aconseja incluir un suero control valorado o un suero conocido en cada análisis de muestras.

Valores

La actividad enzimática de cada fracción puede calcularse a partir de los valores densitométricos en tanto por ciento de cada fracción y la actividad total de la FAL. Para cuantificar todos lo isoenzimas de la FAL, lea los carriles "con" y "sin" lectina.
Los valores de los isoenzimas L1 y P1 se determinan en el carril con lectina. El valor del isoenzima B se obtiene restando los valores densitométricos de las fracciones L1 y P1 obtenidos en el carril con lectina del valor de la fracción L1 + B (+ P1) del carril sin lectina. Todas las demás fracciones, L2, I1, I2, I3, P2 y el complejo lipo-ISO-PAL se determinan en el carril sin lectina.

Valores normales

Los valores normales de los isoenzimas individuales varían con la edad, el sexo, el estado hormonal (embarazo, menopausia, pubertad) y las medicaciones. En individuos adultos, de 20 a 50 años de edad, los valores son casi independientes de la edad. En niños, la FAL total está aumentada debido al isoenzima óseo predominante. Los valores normales de los principales isoenzimas de la fosfatasa alcalina separados mediante electroforesis en los geles HYDRAGEL ISO-PAL han sido establecidos a partir de una población sana de 100 adultos (hombres y mujeres) y 50 niños:

	MUJERES		HOMBRES		NINOS	
	%	UI/L	%	UI/L	%	UI/L
FAL total *		≤ 80		≤ 122		≤ 410
L1	18 - 72	≤ 45	15 - 71	≤ 64	1 - 31	≤ 51
B	20 - 74	≤ 44	23 - 75	≤ 73	62 - 100	≤ 370
L2	1 - 14	≤ 8	1 - 9	≤ 8	1 - 7	≤ 19
I1, I2, I3	Los isoenzimas intestinales están ausentes en alrededor de un 60 % de los individuos normales ; cuando están presentes no superan el 14 %.					

* La actividad total de la FAL de la tabla superior ha sido determinada a 37 °C en tampón AMP.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de normalidad.

Los valores de actividad superiores (IU/L) representan los valores normales máximos. Los valores normales de la actividad total de la FAL (IU/L) dependen del procedimiento y la temperatura usados para determinar la actividad (los kits comerciales y los requisitos del laboratorio pueden variar en este aspecto). Las actividades por fracción deben estar basadas en las actividad total de la FAL y las condiciones del ensayo especificadas.

Interpretación

La interpretación de los patrones electroforéticos requiere conocer la actividad total de FAL de la muestra, el sexo y la edad del paciente. Todas las fracciones sializadas son ralentizadas en cierto grado en el carril con lectina comparadas con el carril sin lectina. Sólo las fracciones intestinales no son afectadas por la lectina.

En el carril con lectina, la fracción ósea normalmente forma una única banda definida cerca del punto de aplicación. De vez en cuando, además de la banda definida puede observarse un rastro anódico. Este fenómeno generalmente es debido a que se ha excedido la capacidad de unión de la lectina y, por consiguiente, se ha dado una precipitación incompleta, por ejemplo, cuando el isoenzima óseo está muy elevado, como sucede en los cánceres de hueso y en el metabolismo activo del hueso. El rastro no se extiende en ningún caso a la posición de migración de L1 o P1, por lo que estas dos fracciones pueden cuantificarse de manera precisa mediante la densitometría del perfil con lectina.

Consulte el patrón de migración como ayuda en la identificación de los isoenzimas individuales.

1. Suero normal

Los isoenzimas hepático (L1) y óseo son las dos fracciones que aparecen normalmente en los sueros de individuos sanos. En el HYDRAGEL 7/15 ISO-PAL migran superpuestos en el carril sin lectina y se separan completamente en el carril con lectina.

Pueden también observarse una o varias (hasta tres) fracciones intestinales en el suero normal. A un nivel normal de actividad total de FAL, la presencia de la(s) fracción(es) intestinal(es) no se ha asociado con ninguna condición patológica. En los individuos que no han ayunado y en los que poseen el grupo sanguíneo B ó O aparece este isoenzima intestinal más a menudo.

2. Casos especiales

Isoenzimas hepáticos

Hay dos isoenzimas hepáticos, L1 y L2. La fracción L1 es la más anódica de todos los isoenzimas y la más significativa de los dos isoenzimas hepáticos. L1 está aumentado en algunas enfermedades no malignas (tales como la colestasis, la cirrosis, la hepatitis vírica y en varias patologías biliares y hepáticas). También está aumentado en tumores malignos con metástasis hepáticas, en el cáncer de pulmones y el tracto digestivo y en el linfoma.

La fracción L2 (también denominada macrohepática o hepática rápida) también existe en los individuos sanos pero a una baja concentración (< 8 IU/L). Podría ser de origen membranoso y estar asociada con lipoproteínas. Un aumento de L2 puede darse en la colestasis y en enfermedades biliares (por ejemplo, cirrosis, hepatitis vírica) y en tumores malignos (por ejemplo, de pecho, hígado, pulmón, próstata, aparato digestivo) con metástasis hepática. En los geles HYDRAGEL 7/15 ISO-PAL, L2 migra claramente entre las fracciones (L1 + B) y las intestinales.

Isoenzima óseo

Este es un isoenzima significativo presente en todas las muestras. La fracción ósea tiene que interpretarse respecto a la edad, ya que su elevación es fisiológicamente normal durante la edad de crecimiento. El aumento del isoenzima óseo está asociado principalmente con las afecciones siguientes:

- En tumores malignos como el cáncer de pecho con metástasis ósea o hepática. También en el osteosarcoma y en el linfoma con o sin metástasis.
- En enfermedades reumáticas, hiperparatiroidismo, enfermedad de Paget y en el raquitismo.
- En la hiperfosfatasemia transitoria de la infancia, que está asociada con una fracción hepática especial (más anódica que la L1). En tal caso, la FAL total está muy elevada (> 2000 IU/L).

Cuando está asociada con el aumento de otra fracción (por ejemplo, L1, L2), puede indicar malignidad del recto, pulmón y próstata (con metástasis ósea y hepática).

Isoenzimas intestinales

La movilidad de los isoenzimas intestinales del adulto es la misma en los dos carriles. Pueden verse como 1, 2, ó 3 fracciones. Alrededor de un 40 % de los individuos normales poseen el isoenzima intestinal. Su actividad puede estar aumentada en algunas enfermedades, como la cirrosis hepática, la diabetes y el fallo renal crónico.

Isoenzima placentario

Siempre hay dos formas de isoenzimas placentarios: la forma principal P1, y la forma minoritaria P2, que representan alrededor del 90 % y el 10 %, respectivamente. Se encuentra durante el embarazo y en algunas enfermedades malignas, principalmente en cánceres ováricos, así como en los sarcomas y en cánceres pancreáticos y de estómago. Su aumento puede deberse también a fumar en exceso (se libera desde los pulmones).

Complejo de inmunoglobulina o macro-fosfatasa alcalina

Esta fracción aparece raras veces. Es un complejo de inmunoglobulina / FAL. Permanece muy cerca del punto de aplicación en ambos carriles.

Complejo fosfatasa alcalina / LP

Este es un complejo de lipoproteína/ L2. Permanece muy cerca del punto de aplicación en ambos carriles. Puede aparecer en enfermedades biliares obstructivas.

Isoenzimas atípicos

Los isoenzimas con migraciones atípicas, como el Nagao, Regan y Kasahara, son difíciles de identificar.

Limitaciones

Consulte **MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS.**

Los lípidos y la bilirrubina (hasta 100 mg/L) a elevadas concentraciones no interfieren en la determinación de los isoenzimas de la FAL usando el procedimiento HYDRAGEL 7/15 ISO-PAL.

NOTA: En una muestra ictérica, la coloración amarilla debida a la presencia de bilirrubina se reparte en 2 fracciones. Una aparece al nivel de la Albúmina, lo que significa que es 1 cm más rápida que la fracción Hepática 1, y la otra, más difusa, está situada al mismo nivel que la fracción Hepática 2.

Después de la detección de los diferentes isoenzimas de la fosfatasa alcalina con el sustrato específico, esta tinción amarilla es eliminada en la absorción con papel de filtro grueso y en las últimas etapas de lavado. Las trazas residuales de bilirrubina no interfieren durante la lectura del HYDRAGEL 7/15 ISO-PAL, porque su tinción azul se lee con un filtro amarillo (570 nm).

Resolución de problemas

Llame al Servicio de Atención Técnica de su distribuidor cuando la prueba no funcione pese a haber seguido cuidadosamente las instrucciones para la preparación y almacenaje de los materiales y para el procedimiento.

Las hojas de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como las informaciones relativas a la eliminación de los desechos, están disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de su distribuidor.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Se usó el densitómetro HYRYS de SEBIA en todas las medidas densitométricas.

Reproducibilidad intraserial

Tres muestras de suero diferentes (A, B & C) fueron sometidas a electroforesis en geles HYDRAGEL 15 ISO-PAL del mismo lote. Las muestras eran: A – suero normal ; B – suero con fracciones intestinales I1 e I2 ; C – suero con las fracciones hepáticas L1 y L2 elevadas. Cada muestra se aplicó en todos los carriles de un único gel. Las separaciones electroforéticas fueron evaluadas mediante densitometría. La tabla siguiente muestra las medias, SD y CV de cada fracción de fosfatasa alcalina en cada muestra de suero para cada gel.

PARÁMETRO	% L1	% B	% L2	% I1	% I2	% I3
Muestra A						
MEDIA	53.2	39.9	6.9	/	/	/
SD	0.9	1.0	0.1	/	/	/
CV (%)	1.7	2.4	1.8	/	/	/
Muestra B						
MEDIA	38.4	33.9	5.9	6.1	12.8	2.9
SD	1.0	0.5	0.1	0.2	0.5	0.1
CV (%)	2.5	1.6	2.4	3.9	3.8	5.1
Muestra C						
MEDIA	55.2	11.7	33.1	/	/	/
SD	0.6	0.7	0.6	/	/	/
CV (%)	1.1	6.0	1.9	/	/	/

Reproducibilidad interserial

Se analizaron siete muestras de suero diferentes en 10 geles HYDRAGEL 15 ISO-PAL del mismo lote. Las medias, SD y CV (n = 10) se calcularon para cada muestra de suero y cada fracción de fosfatasa alcalina. Los resultados fueron esencialmente los mismos en todas las muestras. La tabla siguiente muestra la gama de SD y CV que representa a todas las muestras y un CV medio calculado a partir de los CV agrupados de todas las muestras.

FRACCIÓN	SD	CV (%)	CV MEDIO (%)
L1	0.4 - 1.3	0.7 - 17.2	6.6
P1	1.0 - 1.3	2.1 - 4.2	3.1
B	0.3 - 1.7	0.3 - 7.9	4.1
L2	0.2 - 0.5	1.2 - 12.7	6.2
P2	0.6 - 0.9	3.3 - 11.3	7.3
I1	0.2	4.4 - 9.8	7.1
I2	0.4	3.5	3.5
I3	0.2 - 0.3	7.1 - 20.8	13.9

Exactitud – Estudio comparativo

Se analizaron sesenta (60) muestras de suero diferentes (normales y patológicas) usando el kit de SEBIA HYDRAGEL 15 ISO-PAL y otro sistema comercial para la determinación electroforética de los isoenzimas de la fosfatasa alcalina. Había una concordancia perfecta entre las dos pruebas en la detección visual de los isoenzimas de la fosfatasa alcalina. Los resultados del análisis de regresión lineal de los valores densitométricos de las fracciones L1, Ósea y L2 (n = 60) están tabulados debajo (y = valores de SEBIA).

Parámetro	Coeficiente de correlación	Intersección en y	Pendiente	Gama de valores en IU/L (prueba de SEBIA)
Fracción L1	0.994	- 3.840	0.946	12 - 556
Fracción B	0.968	5.307	0.978	12 - 387
Fracción L2	0.993	4.396	0.985	0 - 288

Sensibilidad

Una muestra de suero con las fracciones I1, I2 e I3 y otra con las fracciones P1 y P2 fueron diluidas serialmente y las diluciones se sometieron a electroforesis en un gel HYDRAGEL 15 ISO-PAL. La menor actividad detectada mediante densitometría de los isoenzimas individuales oscilaba entre 2 y 3 IU/L.

Linealidad

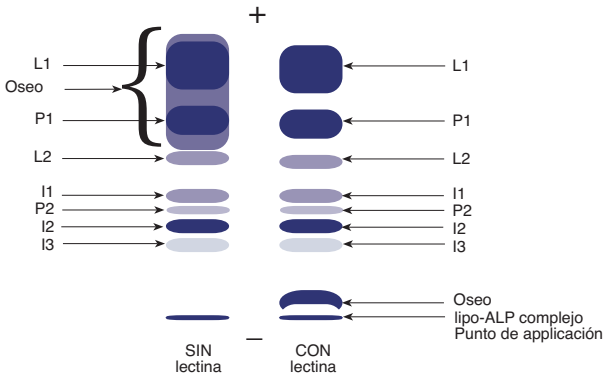
Se usaron dos muestras: la n° 1 contenía L1 y L2 (FAL total 1000 IU/L) ; la n° 2 contenía L1 y B (FAL total 600 IU/L). Se analizaron diluciones seriales que oscilaban entre 1000 - 10 IU/L y 600 - 50 IU/L, respectivamente, en geles HYDRAGEL 15 ISO-PAL. El sistema fue lineal dentro de toda la gama estudiada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bayer PM. Intestinal alkaline phosphatase and the ABO blood group system. A new aspect. *Clin. Chem. Acta*, 1980, 108, 81-87.
2. Farley J *et al.* Skeletal alkaline phosphatase activity in serum. *Clin. Chem.*, 1995, 41, 1551-1553.
3. Faure G *et al.* Les phosphatases alcalines : aspect génétique, identification et interprétation clinique. *Ann. Biol. Clin.*, 1990, 48, 119-125.
4. Fishman WH. Alkaline phosphatase isoenzymes : Recent progress. *Clin. Biochem.*, 1990, 23, 99-104.

5. Foucault P. Interêt de l'étude des phosphatases alcalines totales et de l'isoenzyme osseuse dans une population de sujets atteints d'ostéoporose. *Ann. Biol. Clin.*, 1991, 49, 477-481.
6. Kuwana T *et al.* Reference limits of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in the serum of healthy subjects according to age and sex as determined by wheat germ lectin affinity electrophoresis. *Clin. Chem. Acta*, 1988, 173, 273-280.
7. Mc Kenna MJ, Hamilton TA, Sussman HH. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. Structural evidence for three protein classes. *Biochem. J.*, 1979, 181, 67-73.
8. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin. Chem.*, 1982, 28, 2007-2016.
9. Moss DW. Diagnostical aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes. *Clin. Biochem.*, 1987, 20, 225-230.
10. Piva MT. Détection de métastases hépatiques d'un cancer digestif. Interêt des phosphatases alcalines, de leur isoenzyme macromoléculaire et de la ceruléoplasmine. *Ann. Biol. Clin.*, 1997, 55, 209-214.
11. Rosalki SB *et al.* Lectin affinity electrophoresis of alkaline phosphatase for the differentiation of bone and hepatobiliary disease. *Electrophoresis*, 1989, 10, 604- 611.
12. Saheki S *et al.* Intestinal type alkaline phosphatase hyperphosphatasemia associated with liver cirrhosis. *Clin. Chem. Acta*, 1992, 210, 63-73.
13. Schiele F, Henny J, Hitz S, PetitClerc C, Gueguen R, Siest G. Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma : biological variation and reference limits. *Clin. Chem.*, 1983, 23, 634-641.
14. Van Hoof VO, Lepoutre LG, Hoylaerts MF, Chevigne R, De Broe ME. Improved agarose electrophoretic method for separating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin. Chem.*, 1988, 34, 1857-1862.
15. Van Hoof VO and Van Mullen M. Comparison of two commercially available systems for the electrophoretic separation of alkaline phosphatase isoenzymes. *J. Chrom.*, 1993, 646, 235-243.
16. Van Hoof VO *et al.* Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Clinical Lab. Sci.*, 1994, vol 31, issue 3.
17. Van Hoof VO. Alkaline phosphatase isoenzyme patterns in malignant disease. *Clin. Chem.*, 1992, 38, 2546-2551.
18. Vergote I. Placental alkaline phosphatase as a tumor marker in ovarian cancer. *Obstet-Gynecol.*, 1987, 69, 228-232.
19. Woitge MW *et al.* Comparison of total and bone-specific alkaline phosphatase in patients with non skeletal disordey or metabolic bone diseases. *Clin. Chem.*, 1996, 42, 1796-1804.
20. Wolf P. Clinical significance of serum high molecular mass, alkaline phosphatase, alkaline phosphatase – lipoprotein X complex and intestinal variant alkaline phosphatase. *J. Clin. Lab. Anal.*, 1994, 8, 172-176.

PATRONES DE MIGRACIÓN



SCHÉMAS / FIGURES

Figure 1

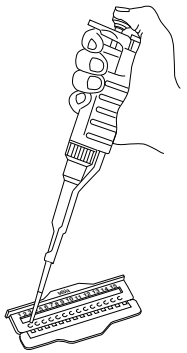


Figure 2

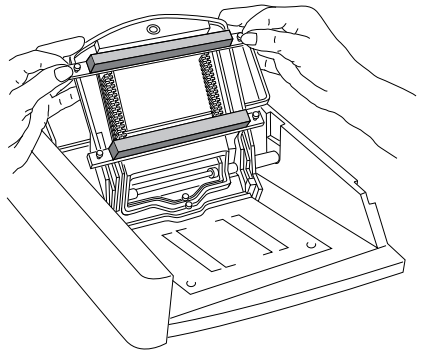


Figure 3

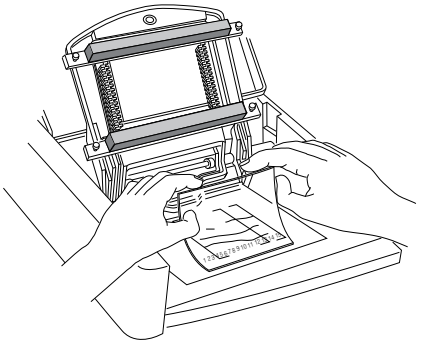


Figure 4

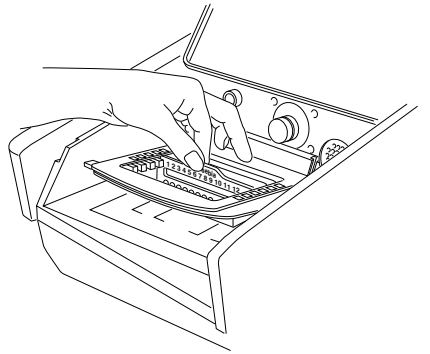


Figure 5

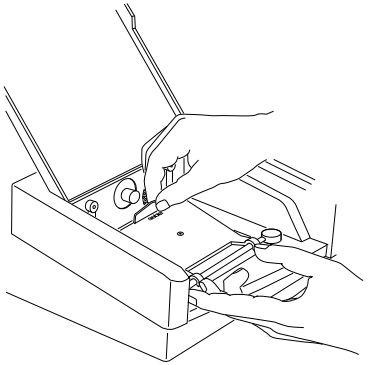
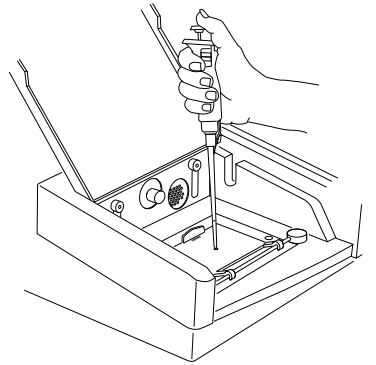


Figure 6



SCHÉMAS / FIGURES

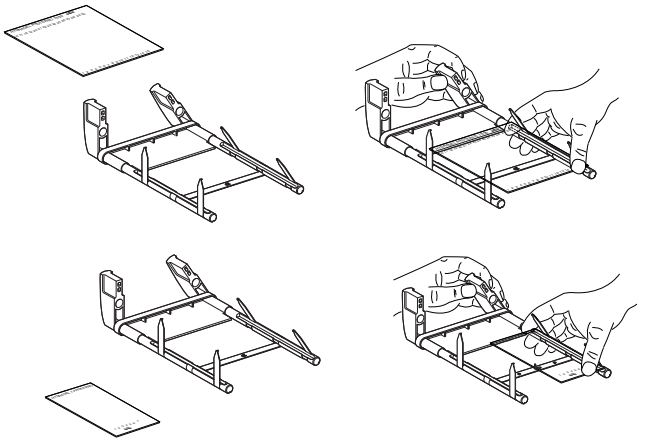



Figure 7